

УДК 536.6:541.183

УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ ПРОФЛАВИНА БЫЧЬИМ ПАНКРЕАТИЧЕСКИМ α -ХИМОТРИПСИНОМ В СМЕСЯХ ВОДА–АЦЕТОНИТРИЛ

В.А. Сироткин, Т.А. Мухаметзянов, Б.Н. Соломонов

*(Казанский государственный университет, химический факультет,
e-mail: Vladimir.Sirotkin@ksu.ru)*

С помощью метода УФ-спектрофотометрии изучена способность бычьего панкреатического α -химотрипсина к связыванию профлавина в зависимости от состава водно-ацетонитрильной смеси. Содержание органического растворителя варьировалось от 0 до 99,5 об.%. Обнаружено, что существует сложная зависимость связывающей способности α -химотрипсина от содержания ацетонитрила (АН). В чистом водном растворе способность фермента к связыванию самая высокая. При содержании АН 4,5 об.% степень связывания профлавина падает приблизительно в 2,3 раза. Повышение концентрации АН (30–70 об.%) существенным образом воздействует на свойства фермента: он практически не связывает профлавин. Однако при более высоких концентрациях органического растворителя (80–98,5%) фермент частично восстанавливает свою связывающую способность. В “сухом” ацетонитриле фермент практически не связывает профлавин. На основании литературных данных по состоянию водородных связей воды в ацетонитриле изменения в связывающей способности фермента были интерпретированы как результат одновременного действия следующих факторов: разрушение пространственной сетки водородных связей воды и понижение конформационной подвижности белковой макромолекулы при уменьшении содержания воды.

В последние два десятилетия интенсивно ведутся работы по ферментативному катализу в органических средах, в результате которых появилось новое научное направление – управление ферментативными реакциями

путем варьирования природы органического растворителя. В таких системах смена естественного водного окружения белка на нетипичное органическое приводит к тому, что белковые макромолекулы проявляют новые уникальные свойства.

Главные преимущества, которые могут быть получены при замене водного окружения фермента органическим, заключаются в следующем [1]. Применение в качестве реакционной среды органических растворителей позволяет проводить ферментативные реакции с гидрофобными веществами, нерастворимыми в воде; появляется возможность проводить в неводных органических средах реакции, не протекающие в водной среде (например, ацилирование, этерификация, перэтерификация). Повышенная термостабильность белковых катализаторов позволяет им функционировать в органических средах десятки часов при температуре порядка 100–120°. Осушенные белки способны запоминать “водную” конформацию субстрата и селективно связывать их в органических средах (явление “молекулярной памяти”). Ферментативный катализ в органических растворителях – это конкурентноспособный и экономичный путь к синтезу высокочистых лекарственных препаратов, избирательно действующих гербицидов и пестицидов, реагентов тонкого химического синтеза, пищевых продуктов.

В настоящее время становится очевидным, что изучение закономерностей биокатализа в органических средах позволяет не только оптимизировать биотехнологические процессы, но и существенно расширяет наши представления о стабильности белковых макромолекул и о межмолекулярных силах, поддерживающих каталитически активную конформацию ферментов; дает информацию, недоступную в рамках традиционных “водных” исследований. Одной из актуальных проблем в этой области является выяснение природы межмолекулярных сил, управляющих функционированием белковых катализаторов в органических средах с низким содержанием воды.

Установлено, что реакции, катализируемые ферментом α -химотрипсином в воде и безводных органических средах, имеют единый механизм [2]. Классическими конкурентными ингибиторами реакций, катализируемых α -химотрипсином, являются ароматические соединения и, в частности, соединения акридинового ряда [3–6]. Одним из таких соединений является профлавин (3,6-диаминоакридин). Такие ингибиторы можно рассматривать как структурные аналоги боковой цепи специфических субстратов данного фермента. Поэтому закономерности образования комплекса фермент–ингибитор могут быть распространены и на механизм образования комплекса Михаэлиса в случае самих субстратов. Изучение связывания конкурентного ингибитора профлавина α -химотрипсином может

оказаться весьма полезным для понимания природы межмолекулярных сил, действующих в неводном окружении.

В настоящей работе было изучено связывание профлавина α -химотрипсином в воде, естественном белковом окружении, а также в органическом растворителе с разным содержанием воды.

В качестве органического растворителя был выбран ацетонитрил. Эта органическая жидкость широко используется при изучении закономерностей ферментативного катализа физико-химическими методами [7–11].

Экспериментальная часть

Материалы. Лиофилизированный препарат бычьего панкреатического α -химотрипсина (ЕС 3.4.21.1, “Sigma”, С-4129, Type II) и профлавин (Р-2508, “Sigma”, lot. 50K3673, С1811-28-51) были использованы без дополнительной очистки. Каталитическая активность α -химотрипсина в данном образце составляла 52 ед./мг препарата. Одна единица гидролизует 1,0 мкм этилового эфира N-бензоил-L-тирозина в 1 мин при рН 7,8 и $T = 25^\circ$. Влагосодержание лиофилизированного исходного белкового препарата составляло 7,5% (г воды/г сухого белка), что было определено на микротермоанализаторе “MGDTD-17S SETARAM” осушкой при 25° и давлении 0,1 Па до установления постоянной массы образца. Ацетонитрил (АН) очищали и осушали в соответствии с рекомендациями [12].

Растворимость фермента в водно-органических смесях. Растворимость α -химотрипсина существенным образом зависит от состава смеси вода–ацетонитрил и носит выраженный пороговый характер, что было установлено в [13]. Весь диапазон значений концентрации воды можно, в соответствии с наблюдаемым изменением растворимости, разделить на три области: 1) в области значений $x_{\text{в}}$ от 0,01 до 0,15 мольных долей воды при низкой и средней активности воды ($a_{\text{в}} < 0,75$) белок практически полностью нерастворим; 2) при $x_{\text{в}} > 0,15$ и $a_{\text{в}} > 0,75$ растворимость α -химотрипсина резко возрастает и достигает максимального значения при $x_{\text{в}} = 0,8$ и $a_{\text{в}} = 0,9$; 3) во всем остальном диапазоне составов ($x_{\text{в}} = 0,8–1,0$; $a_{\text{в}} = 0,9–1,0$) белок растворим полностью.

УФ-спектрофотометрический эксперимент. Измерения проводили на сканирующем двухлучевом УФ-спектрометре “Ламбда 35” (Perkin-Elmer) при следующих условиях: $T = 25^\circ$; 0,01М трис-НСL буфер рН 8,0; концентрация ацетонитрила 0–99,5 об.%. Исходная концентрация профлавина составляла 1×10^{-5} М. Концентрацию фермента варьировали от $6,2 \times 10^{-6}$ до $1,9 \times 10^{-4}$ М. Использовали оптические кюветы с $l = 1$ см. Метод определения связывания профлавина α -химотрипсином (в области концентраций ацетонитрила, где фермент растворим) состоит в следующем. Взаимодействие

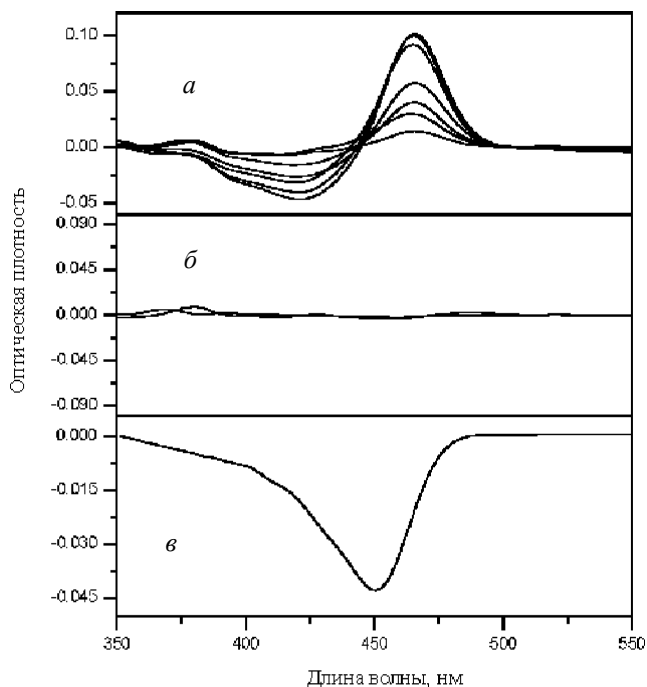


Рис. 1. Разностные спектры профлавина в присутствии α -химотрипсина в воде и водно-ацетонитрильных смесях при 25°: а – водный раствор; 0,01М трис-HCL буфер pH 8,0. Исходная концентрация профлавина – 1×10^{-5} М. Концентрацию фермента варьировали от $6,2 \times 10^{-6}$ до $1,9 \times 10^{-4}$ М; б – водно-органическая смесь с содержанием ацетонитрила 30 об.%. Представлено два спектра для демонстрации уровня воспроизводимости эксперимента; в – водно-органическая смесь с содержанием ацетонитрила 96,5 об.%. В случаях б и в исходные концентрации профлавина и фермента составляли $1,0 \times 10^{-5}$ М и $1,9 \times 10^{-4}$ М соответственно, а концентрация трис-HCL буферной смеси составляла 0,01 М

профлавина с активным центром фермента приводит к смещению спектра красителя ($\lambda_{\text{макс}} = 444$ нм в воде) в длинноволновую область. Разностный спектр раствора профлавина относительно такого же раствора в присутствии фермента является мерой образования комплекса фермент–профлавин. Величина максимума в разностном спектре ($\lambda_{\text{макс}} = 465$ нм в воде) пропорциональна концентрации профлавина, связанного в комплекс.

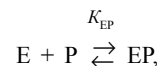
В той области составов водно-ацетонитрильной смеси, где белок нерастворим, картина разностных спектров меняется. Связывание профлавина α -химотрипсином в данном случае приводит к появлению минимума в разностных спектрах. Величина минимума зависит от снижения концентрации профлавина в растворе за счет связывания его ферментом. Долю связанного профлавина определяли из отношения величины минимума в разностном спектре профлавина к величине максимума в спектре исходного раствора.

Результаты

УФ-спектры профлавина в воде и смесях с низким содержанием ацетонитрила. На рис. 1, а представлены разностные спектры профлавина в присутствии α -химотрипсина, снятые относительно исходного

раствора профлавина в воде. С увеличением концентрации фермента величина максимума ($\lambda = 465$ нм) в разностных спектрах растет, стремясь к предельному значению. Аналогичные по форме спектры были получены для водно-органической смеси с содержанием ацетонитрила 4,5 об.%. В этом случае величина максимума в разностных спектрах составляла 467 нм.

Определение термодинамических параметров связывания профлавина в воде и водных растворах с низким содержанием ацетонитрила. Связывание профлавина α -химотрипсином может быть описано следующей схемой:



где EP – комплекс фермента с профлавином, K_{EP} – константа образования комплекса. Так как белок имеет пренебрежимо малое поглощение в области максимального различия в поглощении свободного и связанного профлавина, то $\Delta A = (\epsilon_{EP} + \epsilon_p)[EP]$, где ΔA – наблюдаемое различие в поглощении при данной длине волны, ϵ_{EP} и ϵ_p – коэффициенты экстинкции связанного и свободного профлавина соответственно при той же длине волны. Максимально возможное различие в поглощении

$$\Delta A_{\text{макс}} = (\epsilon_{EP} + \epsilon_p)[P]_0$$

достигается в том случае, когда весь профлавин связан в комплекс и концентрация комплекса равна исходной концентрации профлавина. При $[E]_0 \gg [EP]_0$, что соответствует условиям нашего эксперимента, выражение может быть приведено к виду:

$$\Delta A = (\Delta A_{\text{макс}} K_{EP} [E]_0) / (1 + K_{EP} [E]_0), \quad (1)$$

где $[E]_0$ – общая концентрация фермента. Обработка экспериментальных данных в рамках этой модели позволяет получить значение K_{EP} . В координатах $1/\Delta A - 1/[E]_0$ выражение сводится к линейному виду:

$$1/\Delta A = 1/\Delta A_{\text{макс}} + 1/(\Delta A_{\text{макс}} K_{EP} [E]_0). \quad (2)$$

Значение K_{EP} может быть получено из отношения углового коэффициента к свободному члену.

В табл. 1 полученные нами данные сопоставлены с литературными. Наблюдаемое согласие между величинами K_{EP} , полученными разными методами, свидетельствует о надежности применяемой нами УФ-спектрофотометрической методики.

Изучение связывания профлавина в водно-органической смеси с содержанием ацетонитрила 4,5 об.%. проводили по той же модели, что и в чистой воде, поскольку при этом составе смеси белок полностью растворим. Значение константы образования комплекса фермент–профлавин в этом случае оказалось заметно ниже и составило 3240 ± 1300 л/моль (табл. 1). По уравнению (1)

Т а б л и ц а 1

Величины констант связывания профлафина α -химотрипсином K_{EP} в водных растворах и водно-органической смеси с содержанием ацетонитрила 4,5 об.%

Литература	Условия связывания профлафина α -химотрипсином	K_{EP} , л/моль
Настоящая работа	в отсутствие субстрата; $T = 25^\circ$; pH 8,0	26400±4000
Настоящая работа	$T = 25^\circ$; pH 8,0 4,5 об.% ацетонитрила	3240±1300
[6]	pH 7,6	22000±3200**
[5]	pH 8,0	25700±2000
[4]	pH 6,5	30300*
[3]	$T = 30^\circ$; pH 8,0	47000±2200
[5]	Кинетические данные; pH 8,0	27000±2200

* Значение ошибки не указано. ** Рассчитано по данным работы [6] с использованием уравнения (1).

можно оценить долю профлафина, находящегося в связанном состоянии, при некоторой фиксированной концентрации фермента из отношения $\Delta A/\Delta A_{\text{макс}}$. Так, при концентрации фермента $1,9 \times 10^{-4}$ М в чистом водном растворе доля связанного профлафина составляет 83,3%, а при содержании ацетонитрила 4,5% она равна 36,8%.

УФ-спектры профлафина в смесях с высоким содержанием ацетонитрила. На рис. 1, б представлены разностные спектры профлафина в присутствии α -химотрипсина, полученные относительно исходного раствора профлафина в водно-ацетонитрильной смеси с содержанием органического растворителя 30,0 об.%. Как видно из рисунка, возмущение спектров профлафина белком отсутствует, из чего можно сделать вывод, что в такой смеси фермент не связывает профлафин. Аналогичные результаты были получены в смесях, содержащих 70,0 об.% АН.

На рис. 1, в изображены разностные спектры профлафина в присутствии α -химотрипсина, измеренные относительно исходного раствора профлафина в водно-ацетонитрильной смеси с содержанием АН 96,5 об.%. При такой концентрации белок нерастворим [13], поэтому наличие в разностных спектрах минимума

(значение λ , равное 450 нм, соответствует длине волны максимума в спектре исходного раствора профлафина) было связано с убылью профлафина за счет связывания его ферментом. Отношение величины минимума в разностном спектре к величине максимума в спектре исходного раствора соответствует доле связанного профлафина при данной концентрации белка. В табл. 2 представлены величины степени связывания профлафина при фиксированной концентрации α -химотрипсина в зависимости от концентрации ацетонитрила.

Обсуждение результатов

Для объяснения полученных результатов по связыванию профлафина α -химотрипсином были использованы литературные данные по конформационной подвижности белковых макромолекул [14] и состоянию водородных связей воды в ацетонитриле [15].

Хорошо известно, что свойства водных растворов гетерофункциональных (т.е. содержащих гидрофильные и гидрофобные группы) неэлектролитов определяются, главным образом, влиянием двух факторов: специфические взаимодействия между водой и гидрофильными группами молекул неэлектролита и гидрофобные взаимодействия [16, 17]. При этом общую информацию об изменениях в энергии водородных связей воды с окружающими молекулами содержат интегральные коэффициенты экстинкции воды (ИКЭВ). На рис. 2 представлена зависимость величин относительных интегральных коэффициентов экстинкции (B/B_0) полосы валентных колебаний воды от ее термодинамической активности в ацетонитриле, полученная в работе [15].

Как можно видеть из рис. 2, в области относительно низкой и средней активности воды ($\leq 0,75$) в ацетонитриле величины ИКЭВ практически не зависят от влажности растворителя. На основании анализа контура полосы поглощения ОН-групп воды было установлено [15, 16], что в этом интервале составов вода находится преимущественно в виде комплексов с органическими молекулами. При $a_w > 0,75$ наблюдается скачкообразное повышение величины B/B_0 с выходом на уровень, соответствующий чистой воде. Поскольку хорошо известно, что принципиальной особенностью чистой воды является наличие у нее трехмерной пространственной сетки водородных связей, то такое резкое падение величин интегральных коэффициентов экстинкции при уменьшении содержания воды можно рассматривать как отражение процесса разрушения трехмерной структуры водородных связей воды.

Известно также, что структурная подвижность белков существенно зависит от влажности. Вода способна выступать в качестве своеобразной “молекулярной смазки”, увеличивающей внутримолекулярную динамику [14, 18]. При этом зависимость конформационной подвижности модельного белка лизоцима от его влажности имеет пороогообразный характер, начиная резко

Т а б л и ц а 2

Зависимость доли профлавина, находящегося в связанном состоянии, и длины волны максимума раствора чистого профлавина ($\lambda_{\text{макс}}$) от содержания ацетонитрила и термодинамической активности воды в водно-ацетонитрильной смеси при фиксированных исходных концентрациях профлавина ($1,0 \times 10^{-5}$ М) и α -химотрипсина ($1,9 \times 10^{-4}$ М)

Объемная доля ацетонитрила, %	Мольная доля воды, x_b	Активность воды, a_b	Длина волны максимума $\lambda_{\text{макс}}$, нм	Степень связывания профлавина, %
0	1,0	1,0	444	83,3
4,5	0,99	0,99	445	36,8
30,0	0,87	0,92	450	0
70,0	0,56	0,84	451	0
80,0	0,42	0,81	451	4,3
90,0	0,24	0,75	451	4,6
94,5	0,15	0,62	451	8,2
95,0	0,13	0,6	451	9,0
96,5	0,10	0,49	451	5,8
98,0	0,06	0,34	451	0
99,5	0,013	0,12	451	0

возрастать от минимальных и приблизительно постоянных значений только при влажности >20% (г воды/г белка) [14]. Это соответствует (при сопоставлении с изотермами адсорбции паров воды [19]) области активности воды в системе $a_b > 0,7$ или областям **A** и **B** на рис. 2. Учитывая, что в области низкой и средней активности воды изотермы адсорбции воды белками из газовой фазы и органических растворителей близки [20], мы можем предположить, что и для α -химотрипсина, суспендированного в смеси вода–ацетонитрил, количество сорбированной воды в диапазоне **C** и, следовательно, его конформационная подвижность не превышают аналогичных значений для газовой фазы. Этот вывод качественно подтверждается и данными других авторов: конформационная подвижность белковых макромолекул в безводных органических средах ниже, чем в воде, однако она существенно повышается с увеличением влажности растворителя [21, 22].

Как можно видеть из рис. 2, на кривой зависимости степени связывания профлавина α -химотрипсином от содержания воды в органической среде можно условно выделить три этапа. С учетом представленной выше информации по конформационной подвижности белковых макромолекул и состоянию водородных связей воды в ацетонитриле такая трехэтапная зависимость может быть объяснена следующим образом.

В области высокой активности (рис. 2, диапазон **A**) вода образует пространственную сетку водородных связей, и гидрофобные взаимодействия реализуются в полном объеме. Белок имеет структуру, близ-

кую к нативной, а также высокий уровень молекулярной подвижности. Связывающая способность α -химотрипсина в этом случае имеет максимальное значение.

В диапазоне **B** частично разрушается сетка водородных связей воды, растет доля молекул воды, связанных молекулами ацетонитрила, ослабевают гидрофобные взаимодействия. В результате неполярные группы молекулы фермента приобретают возможность контактировать с молекулами органического растворителя, что в условиях сохраняющейся высокой конформационной подвижности приводит к денатурации белка.

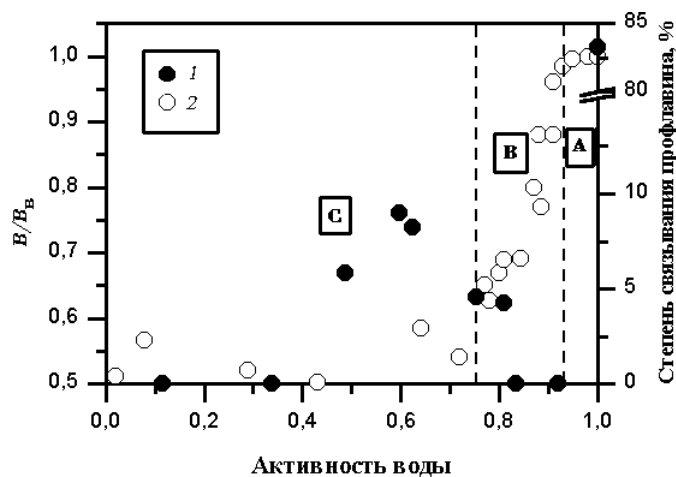


Рис. 2. Зависимость доли профлавина, находящегося в связанном состоянии, при фиксированной исходной концентрации α -химотрипсина $1,9 \times 10^{-4}$ М от активности воды в ацетонитриле (1); зависимость интегрального коэффициента экстинкции воды от активности воды в ацетонитриле (2)

Способность фермента связывать профлаavin падает в этом концентрационном интервале до нуля.

В области низкой активности воды (диапазон С) отсутствует трехмерная сетка водородных связей и исчезают гидрофобные взаимодействия, поддерживающие нативную структуру белка. Однако при этом подвижность белка минимальна, и фермент гораздо более устойчив к воздействию органического компонента, что выражается в сохранении способности к связыванию профлавина.

В области самого низкого содержания воды фермент дегидратирован, по-видимому, настолько сильно, что теряет способность связывать профлаavin. Это означает,

что наличие небольших количеств воды существенно влияет на проявление функциональных свойств ферментов в органических средах.

Таким образом, анализ результатов настоящей работы показывает, что трехэтапное изменение связывающей способности α -химотрипсина является следствием одновременного действия двух факторов:

- 1) разрушение трехмерной пространственной сетки водородных связей воды (состояния водородных связей воды) и ослабление гидрофобных взаимодействий;
- 2) увеличения конформационной жесткости белковых макромолекул при уменьшении содержания воды в органическом растворителе и влажности фермента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Koskinen A.M.P., Klibanov A. M. // Enzymatic Reactions in Organic Media. L., 1996.
2. Klibanov A. M. // Trends in Biochem. Sci. 1989. **14**. P. 141.
3. Martinek K., Levashov A.V., Berezin I.V. // Molekulyarnaya Biologiya. 1970. **4**. P. 517.
4. Fink A.L. // Biochemistry. 1974. **13**. P. 277.
5. Bernhard S.A., Lee B.F., Tashjian Z.H. // J. Mol. Biol. 1966. **18**. P. 405.
6. Glazer A.N. // Biochemistry. 1965. **54**. P. 171.
7. Tomiuchi Y., Kijima T., Kise H. // Bull. Chem. Soc. Jpn. 1993. **66**. P. 1176.
8. Partridge J., Hutcheon G.A., Moore B.D., Halling P.J. // J. Am. Chem. Soc. 1996. **118**. P. 12873.
9. Fitzpatrick P.A., Ringe D., Klibanov A.M. // Biochem. Biophys. Res. Comm. 1994. **198**. P. 675.
10. Slade C.J. // J. Mol. Catalysis B: Enzymatic. 2000. **9**. P. 97.
11. Dabulis K., Klibanov A.M. // Biotechnol. Bioeng. 1992. **39**. P. 176.
12. Perrin D.D., Armarego W.L.F., Perrin D.R. Purification of Laboratory Chemicals. Oxford, 1980.
13. Sirotkin V.A., Zazybin, A.G., Osipova, O.L. et al. // Moscow University Chemistry Bulletin. 2000. **41**. № 6. Supplement. P. 114.
14. Rupley J.A., Careri G. // Adv. Protein Chem. 1991. **41**. P. 37.
15. Сироткин В.А., Соломонов Б.Н., Файзуллин Д.А., Федотов В.Д. // Ж. структур. химии. 2000. **41**. С. 1205.
16. Горбунов Б.З., Козлов В.С., Наберухин Ю.И. // Ж. структур. химии. 1975. **16**. С. 808.
17. Белоусов В.П., Панов М.Ю. Термодинамика водных растворов неэлектролитов. Л., 1983.
18. Gregory R. B. // Protein-solvent interaction. N.Y., 1995. P. 191.
19. Carreri G., Giansanti A., Gratton E. // Biopolymers. 1979. **18**. P. 1187.
20. Halling P.J. // Biochim. Biophys. Acta. 1990. **1040**. P. 225.
21. Broos J., Visser J.W.G., Engbersen J.F.J. et al. // J. Amer. Chem. Soc. 1995. **117**. P. 12657.
22. Affleck R., Xu Z.-F., Suzawa V., Focht K. et al. // J. Amer. Chem. Soc. 1992. **89**. P. 1100.

Поступила в редакцию 25.10.02